中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 33(1)：044～052 (1984)

水田及水稻根部微生物固氮之研究[1]

林　　錫　　錦[2]

摘要：水稻根部微生物固氮力弱，供試 8 個品種間固氮能力於每次採樣時品種間固氮活性之高低無一固定的傾向，水稻抽穗前之固氮活性較其他生長期高，70年第一期稻作之固氮活性較69年第二期稻作低。施用氮肥 (120 kg/ha) 抑制根部微生物之固氮活性。由水稻根部分離到一種普遍存在於根上之革蘭氏陰性短桿固氮菌。

水田田土固氮力微弱，田水無固氮力。種植水稻之水田田土之固氮力比不種植水稻者高些，尤其以水稻抽穗前最顯著，在水稻生育期中，根圈土之固氮活性比底土者高。由水田田土分離到固氮藍綠藻 *Anabaena* sp. 及 *Nostoc* sp.，以及一種廣泛存在於水田田土之革蘭氏陰性短桿固氮細菌。接種十種不同的固氮藍綠藻對盆栽水稻生長效應之研究，發現固氮藍綠藻 HN 801 品系對水稻之株高、穗數及穀產量之肥效約等於或超過施用半量化學氮肥 (N 60kg/ha) 者。

現代之水稻栽培方法中已習慣化學氮肥的大量使用，但水稻生長期中仍自土壤中吸取了過半量其生育期中所需的氮素。據菲律賓國際稻米研究中心試驗結果，在同一土地上連續種植23期稻作，未施氮肥，稻穀產量並未減產[12]，顯然由於微生物固氮而維持地力不衰。這些水稻生長期中所吸收的氮素來自土壤中腐植質，前作殘留藁根分解時與固氮細菌共生，以及水稻根部與水田中林林總總的固氮微生物，如固氮細菌、藍綠藻、滿江紅等所累積之氮肥[1,2,3,11,13]。由於化學氮肥製造過程須消耗大量的能源殊爲不經濟，既然水稻及水田本身的固氮微生物可提供多量氮素，因此對水稻根部微生物的固氮、水田固氮微生物的瞭解、保護及强化其固氮功能實爲今日水稻栽培必須重視的一大課題。本省水稻栽培亦偏用化學氮肥，而且大量農藥的使用很可能造或對固氮微生物生態之破壞。有關水稻根部固氮國外文獻業已證實。[4,5,6,7,8,9,10,14]，本省對於水稻根部固氮及水田微生物固氮尙無資料可供參考，本實驗乃著手探討：(1) 水稻根部微生物固氮之情形及水稻不同品種間固氮能力之差異，提供育種與農民選種及施肥之參考，並希望從中分離出固氮力强之細菌。(2) 對水田一般固氮微生物之固氮力加以廣泛瞭解，藉以篩選其中具有高固氮力之微生物加以培養、保存，提供日後進一步試驗之材料。

材料與方法

一、水稻根部微生物固氮之試驗

(一) 田間試驗：於農試所25號圃場進行

1. 供試品種有高雄 1 號、臺中秈 3 號、臺南 5 號、臺東27號、臺東28號、新竹56號、臺農67號及高雄139號。

---

1. 臺灣省農業試驗研究報告第1144號，本文第一部份承國科會 NSC-70-0409-B055-04 補助，第二部份承農發會71農建一4、1一產38補助，謹誌謝忱。

2. 本所農化系研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

2.試驗方法：

（1）種植期：69年第二期作及70年第一期作。

（2）施肥法：分別施用 $N-P_2O_5-K_2O=120-60-60$ kg/ha 及不施用氮 $N-P_2O_5-K_2O=0-60-60$ kg/ha ，氮肥用硫酸銨，其中 45%當基肥，30% 於插秧後一個月施用，25%於插秧後二個月施用，磷肥用過磷酸鈣，悉數基肥。鉀肥用氯化鉀，分兩次使用，其中 60% 基肥，40%於插秧後一個月施用。

（3）田間設計：施 N 肥與不施 N 肥兩種處理，每品種四重複，完全逢機法行之。每小區面積 9 平方公尺。

（二）室內試驗：

1.從分蘗初期至抽穗期，分適當時間至田間採取根部回實驗室，沖洗泥土後置於 680 ml 血清瓶中，套以塑膠塞，抽出 68 ml 空氣，並打入68 ml 之乙炔氣體，於26 °C下孵育一天後取出 1 ml 氣體，打入氣體色層分析儀中，測定乙稀生成量，並換算成固氮酵素之固氮活性。

2.固氮細菌之分離：以無氮之培養基，分離純化根部之固氮細菌。

二、水田微生物固氮之試驗

（一）田間試驗於本所20號圃場進行。

（二）試驗設計：

1. 分爲四種處理，每種處理面積 6.5 平方公尺，逢機區集設計，各處理爲

（1）不施氮肥，種水稻。

（2）不施氮肥，不種水稻，施用丁基拉草殺草劑 30 kg/ha。

（3）標準施肥區(N 120 kg/ha，45%基肥，30% 追肥，25% 穗肥)，種水稻。

（4）施半量氮肥 N 60 kg/ha，悉數基肥），種水稻。

2.氮肥施用硫酸銨，各區均施磷鉀肥，其用量爲 P_2O_5 80 kg/ha，悉數基肥，施用過磷酸鈣。鉀肥用量爲 K_2O 60 kg/ha，其中60% 基肥、40% 追肥，施用氯化鉀。每小區水稻種植品種共有臺農67號及臺中秈 3 號，以標準插秧法插植。

（三）水田田土及田水固氮活性之測定：於水稻分蘗初期、中期及盛期，及孕穗期至水稻田採取根圈土及根圈以外的底土各25克，根圈土及底土每次取樣各取 3 重複，以乙炔還原法測定其固氮力。以瞭解水田固氮微生物之固氮活性情形。測定時以50 ml 三角瓶內裝 25 cm 高之田土或田水，然後塞以橡膠瓶塞，抽出 4.5 ml 之空氣再打入 4.5 ml 之乙炔，置於室內照明架上一天（其中光照 18 小時），然後抽出 1 ml 之混合氣體打入氣層分析儀中測定乙稀生成量，再換算爲固氮量。

（四）固氮微生物之分離及篩選：攜回已知固氮力之樣品中，先於去氮培養液（視固氮微生物種類而決定所用培養液）中淘汰非固氮之其他微生物，再將所留固氮微生物分離出來，純粹培養後再以乙炔還原法測定其固氮力之强弱。

（五）接種固氮藍綠藻對水稻生長效應之試驗：將10種不同之固氮藍綠藻（由本實驗室分離得到，及由中央研究院黃檀溪博士所分離提供）接種於盆栽水稻，探討其對水稻株高、穗數及穀產量之影響。水稻品種用臺農67號，試驗採完全逢機盆栽設計，13處理：即接種10種不同之固氮藍綠藻，施用全量氮肥（N 120kg/ha），施用半量氮肥（N 60 kg/ha）及不施氮肥亦不接種固氮藍綠藻。

結果與討論

一、水稻根部微生物固氮試驗

水稻田間試驗，從分蘗期至抽穗期分數次採樣做根部微生物固氮之測定，並且比較其品種間固氮

力之差異，其結果如表 1 及表 2 。水稻根部微生物固氮力弱，可能因爲在水田下缺乏氧氣，好氣性的根部固氮菌難於生存，另外嫌氣性的根部固氮菌亦少之故。每次採樣時品種間固氮率之高低均無一定傾向。69年二期作（表 1 ）第一次採樣之固氮活性有的品種比其他時期高，有點奇怪。第二次採樣（

表1. 69年度第二期作稻根之固定氮率 (1)

品種	n mole N_2 fixed/g fresh root/day 採樣期 9/4 +N (2)	9/4 −N	9/12 +N	9/12 −N	9/18 +N	9/18 −N	9/27 +N	9/27 −N	10/3 +N	10/3 −N	10/9 +N	10/9 −N
高雄 1 號	31	21	0	3	4	10	4	11	4	10	9	15
臺中秈 3 號	14	18	1	4	10	27	15	9	7	10	15	24
臺南 5 號	13	37	0	6	4	18	10	18	6	13	18	10
臺東27號	22	27	0	4	3	21	6	33	3	6	7	19
臺東28號	19	22	1	4	6	28	12	13	7	18	15	39
新竹56號	4	24	1	9	6	24	34	18	13	21	28	36
臺農67號	4	31	0	7	10	30	40	16	13	18	28	33
高雄選139號	9	21	0	6	4	22	18	18	10	27	15	13
L. S. D.	15.3		—		6.67		13.91		7.62		10.9	

（1）插秧日期： 7 月30日　　（2）每公頃施氮肥120公斤。

9 月12日）之固氮活性比第一次急速下降，其原因可能爲第一次採樣後鄰近水稻田施肥，下雨後中間的田埂溢水流入本試驗田，氮肥抑制固氮菌之固氮活性。70年一期稻作各品種間之固氮活性除了抽穗前（ 5 月13日）的採樣外，其餘各採樣期其固氮活性均比69年第二期稻作低。表 1 中施用氮肥區各品種間之固氮活性比不施氮肥低，此可能因爲氮肥減低微生物固氮酵素之活性。可是每次採樣時施氮與否之區，因重複間之差異極大，結果不顯著，但是品種間有顯著的差異。

70年第一期作施氮肥區與不施氮肥區其固氮活性無顯著之差異（表 2 ），其原因可能因施肥後下

表2. 70年度第一期作稻根之固氮率 (1)

品種	n mole N_2 fixed/g fresh root/day 採樣期 4/13 +N (2)	4/13 −N	4/23 +N	4/23 −N	5/13 +N	5/13 −N	5/26 +N	5/26 −N
高雄 1 號	0.7	0.1	0.6	0.6	20.5	48.9	0.8	1.6
臺中秈 3 號	0	0.1	0.1	1.6	34.2	42.8	2.0	1.7
臺南 5 號	0.3	0	0.5	1.5	33.1	27.2	1.4	1.1
臺東27號	0.1	0.2	0.7	0.8	25.9	63.8	2.0	1.8
臺東28號	0.1	0.2	0.7	1.7	49.5	52.0	1.6	1.9
新竹56號	0.2	0.2	0.6	1.6	33.8	29.8	1.7	1.0
臺農67號	0.4	0.2	1.0	3.2	25.7	29.7	2.2	0.8
高雄139號	0.2	0.1	0.4	1.6	31.1	25.3	2.1	1.3
L. S. D.	—		—		14.27		—	

（1）2 月23日插秧。　　（2）氮肥每公頃施用 120公斤。

雨，田水溢流入無氮肥區，結果稻株生長濃綠。69年二期作及70年一期作各採樣期之固氮活性均以水稻抽穗前（分別爲９月27日到10月９日，以及５月13日）（表１及表２）固氮活性最高，其餘採樣期間其固氮活性均甚低。由69年二期作及70年一期作觀察水稻之生育情形，不施氮肥區各品種間發育均呈萎黃缺乏氮肥之現象，株高及結穗亦較施氮肥區低。

綜觀田間試驗之結果，水稻根部微生物固氮率甚弱。蓋水稻爲禾本科鬚根作物，其根圈之固氮細菌爲非共生固氮菌，在水田嫌氣情況下，主要之固氮菌爲嫌氣性細菌或半嫌氣性細菌及少數好氣性細菌。這些共生固氮細菌不易在稻鬚根上形成大族羣的固氮細菌，因而固氮率弱。不像豆科作物能够與根瘤菌共生產生根瘤進行多量的固氮。然而菲律賓國際稻米研究中心試驗結果，謂在同一土地上連續種植23期稻作，未施氮肥稻穀產量並未減產（10）。顯然的維持地力不衰的原因可能包括（１）稻桿埋入田中，纖維分解菌與固氮細菌共生，累積一些氮肥於土壤中，例如本人1976年在華盛頓州立大學與Dr. Peter Wong 從事固氮研究工作時，在當地的麥田採取分解中的麥桿，發現在麥桿分解期間有很强的固氮作用，一直到麥桿完全分解後固氮力才消失，在土壤中累積一些氮肥。在實驗室研究的結果發現分解麥桿菌與固氮細菌營共生現象。據中央研究院植物研究所黃檀溪博士謂稻草分解時也有不小的固氮作用。（２）本實驗室70年至71年做水田微生物固氮之研究時，觀察到稻田根圈土及底土亦有一些固氮活性，其中根圈土之固氮活性比底土高並從水稻根部分離到一種普遍存在於根上之革蘭氏陰性短桿固氮細菌（圖１）。其固氮活性隨着水稻長大而增加。（３）各種固氮藍綠藻及固氮細菌在稻田中亦多少會增加一些氮肥供給水稻。

二、水田微生物固氮之試驗

本試驗之目標首先著重於水稻生育過程中田土固氮力變化之探討與固氮微生物之分離。

（一）水田田土及田水固氮能力之分析：

1. 各處理之水田田水均無固氮活性。水田田土固氮力微弱。

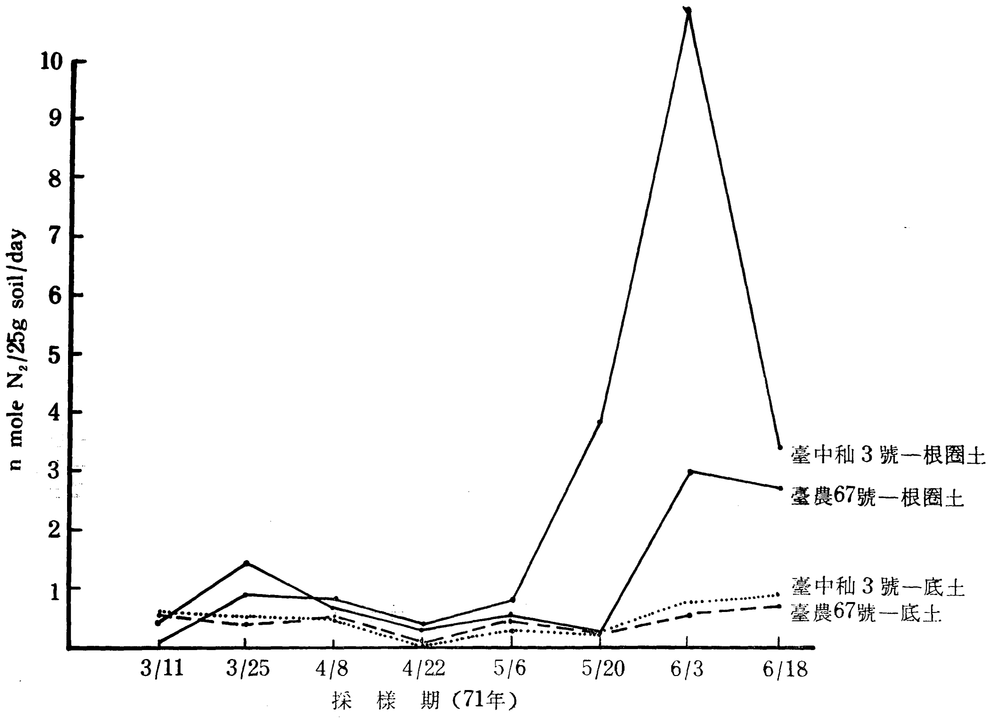

圖2. 種植水稻但不施氮肥之田土固氮活性（３月１日插秧）。

2.種植水稻區（圖2、圖4及圖5之臺中秈3號）之根圈土，其固氮活性以抽穗前的採樣分析（分別爲5月20日及6月3日）差異較顯著，其他時期之根圈土固氮活性無差異。此可能因爲水稻生長到抽穗前，植株及根部的生長爲最大的時期，根部分泌一些養分供給固氮細菌生長繁殖，土壤中非共生固氮細菌的族羣增大，因而其固氮活性增高。底土之固氮活性則種植水稻區（圖2、圖4及圖5）與不種植水稻區（圖3）無差異。

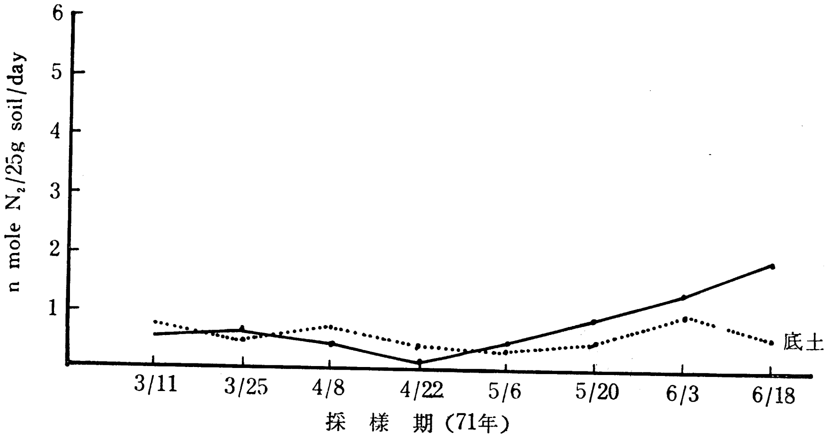

圖3. 不種水稻與不施氮肥但使用殺草劑之田土固氮活性。

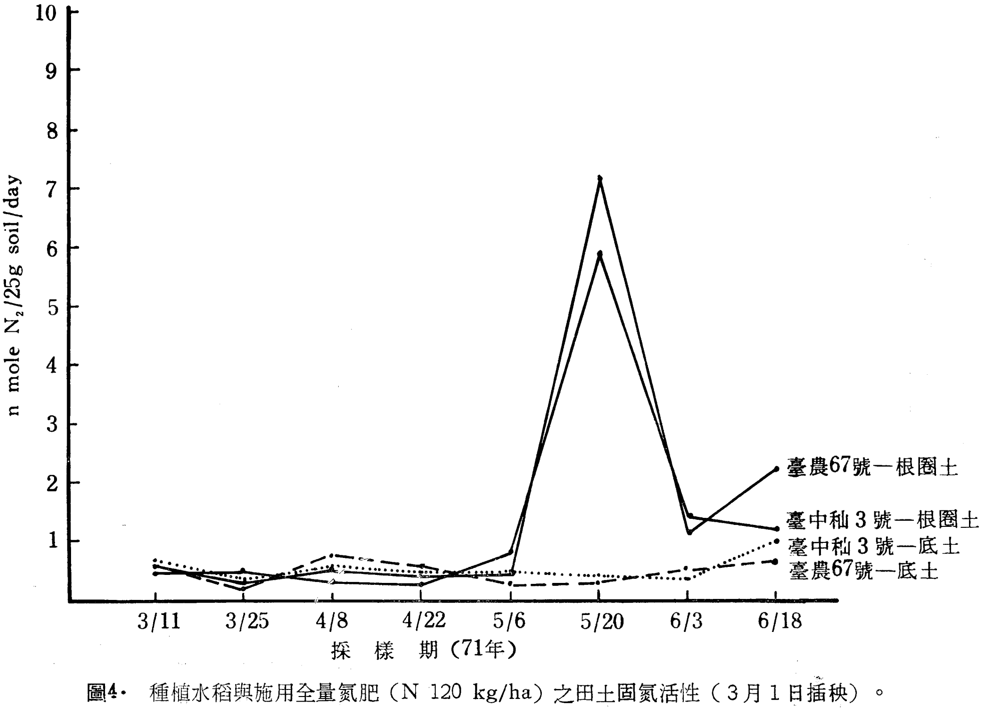

圖4. 種植水稻與施用全量氮肥（N 120 kg/ha）之田土固氮活性（3月1日插秧）。

3.臺中秈3號之根圈土固氮活性在抽穗前採樣之不施氮肥區（圖2之6月3日）比施全量氮肥區（圖4之5月20日）及半量氮肥區（圖5之6月3日）較高。同時期採樣之臺農67號的根圈土固氮活性則以施全量氮肥區（圖4）比不施氮肥區（圖2）或施半量氮肥

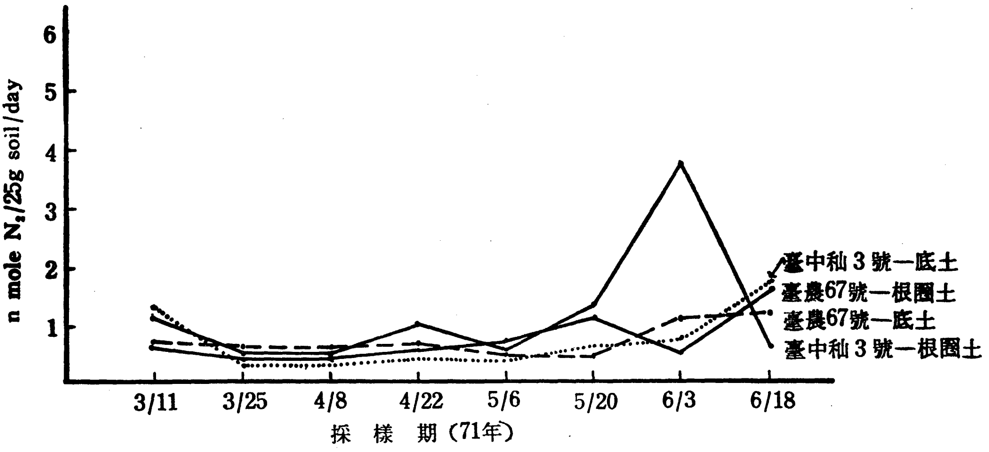

圖5．種植水稻以及施用半量氮肥（N 60kg/ha）之田土固氮活性（3月1日插秧）。

區（圖5）較高。施用全量氮肥區的臺中秈3號及臺農67號之根圈土固氮活性最高期爲5月20日（圖4）比施半量氮肥區或不施氮肥區（圖5及圖2之6月3日）之根圈土最高固氮活性早兩星期，此可能爲施用半量氮肥區或不施氮肥區之水稻植株生長不好，抽穗期比施全量氮肥者晚兩星期，而抽穗前爲根部分泌能供給固氮細菌養分最多的時候。

4.綜觀水田田土固氮力極微弱，底土之固氮活性在四種不同之處理下，其固氮活性均不到 1 nmole N_2/25g soil/day（等於 N 2.24 kg/ha /一期作）（圖2、圖3、圖4及圖5）。在種植水稻區之根圈土固氮活性抽穗前爲最高，可是也只有 3.5～10.2 nmole N_2/25g soil/day（等於 N 7.84～22.85 kg/ha /一期作）。在水田嫌氣情況下，主要之固氮菌爲嫌氣性細菌或半嫌氣性細菌及少數好氣性細菌。這些非共生固氮細菌不易形成大族羣的固氮細菌，因而固氮率極弱。而且水稻爲鬚根作物不像豆科作物能够與根瘤菌共生產生根瘤進行多量的固氮，其結果與原因已如上面第一部分討論中所述。

（二）固氮藍綠藻之分離：一般土壤中固氮藻以絲狀藍綠藻如 Anabaena sp. 及 Nostoc sp. 等居多。這些絲狀藻多會產生粘液，與其他雜藻混生。因此分離之工作頗爲困難。此點以往之研究曾予以討論過。本研究室在進行田土固氮藍綠藻分離時發展出一套方法可有效分離且純化出固氮藻來。其方法如下：欲分離之樣品(包括田土、田水或混生藻團)取少量於去氮之 T 培養液(KH_2PO_4, 0.6g；$MgSO_4$, 0.5g；EDTA-Fe，1ml；微量元素，0.1 ml)內於 700 lux 光照下培養，俟藻類長至肉眼可見時，再以乙炔還原法測定其有無固氮力。然後以顯微鏡鏡檢。一般此時長出多爲固氮藻類，但仍有許多雜藻混生。進一步純化方法是將混有雜藻之藻團以均質機打碎 0.5—1分鐘，此時藻團完全打散，固氮藻亦被打成許多小截，稍微稀釋後取一滴滴於水瓊脂平板上，在50倍之解剖顯微鏡下以微細玻棒挑出單截固氮藻，移植於 T 培養液或斜面上，2—3星期即可長成菌落，長出之菌落再以顯微鏡鏡檢，可確定此菌落是否雜有其他藻類，以此方法進行固氮藍綠藻之分離獲得相當良好之結果。由本研究分離到 Anabaena sp.（圖6）及 Nostoc sp.（圖7）之固氮藍綠藻。

（三）接種固氮藍綠藻對水稻生長效應之試驗：

接種10種不同固氮藍綠藻對盆栽水稻生長效應之研究，發現固氮藍綠藻 HN 801 之品系對水稻之株高、穗數及穀產量之肥效等於施用半量化學氮肥（N 60kg/ha）者（圖9）其餘9種固氮藍綠藻對水稻之肥效不顯著。有關 HN 801 固氮藍綠藻之生理，生化特性及對水稻生長有

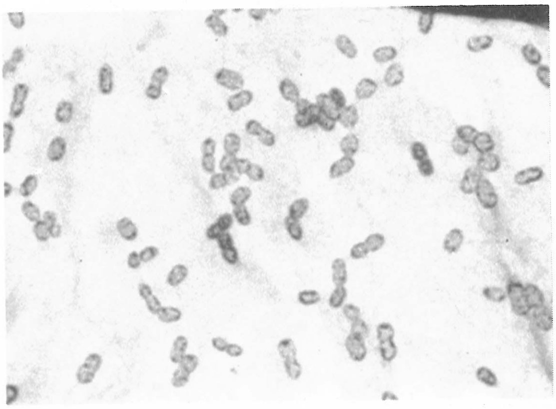

圖6. 由水稻根上分離到的一種廣泛存在於稻根上的革蘭氏陰性短桿固氮細菌。

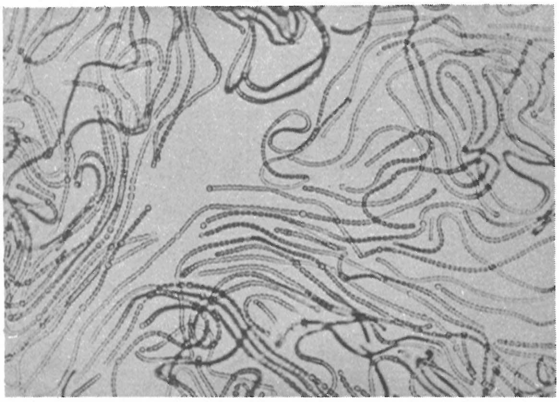

圖7. 分離得到廣泛存在於水田田土的一種固氮藍綠藻 Anabaean sp, 正加以繁殖接種到盆栽水稻對水稻生長效應之研究中。

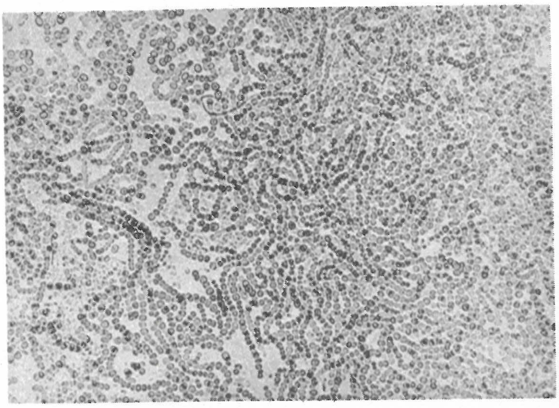

圖8. 分離得到廣泛存在於水田田土的一種固氮藍綠藻 Nostoc sp., 正加以繁殖接種到盆栽水稻對水稻生長效應之研究中。

圖9. 接種固氮藍綠藻 HN 801 對水稻生長之效應。盆栽由左至右爲：全 N＝施用化學氮肥 N 120 kg/ha ；半 N＝施用化學氮肥 N60 kg/ha；－N＝不施肥亦不接種固氮藍綠藻；HN 801 及 HN 801＝接種固氮藍綠藻 HN 801 品系，不施肥料。

利之原因正進一步探討中。

（四）好氣性固氮細菌之分離：分離方法與固氮藻者相似，但使用之培養液係在 T 培養液內加入 10 g/l 之 Glucose（簡稱 Tg 培養液），且樣品加入培養液即置於黑暗中培養，以除去藻類生長。5－6 天後以乙炔還原法測其固氮活性，對有明顯固氮力之樣品再以稀釋平板法在 Tg 平板上，俟長出菌落後在解剖顯微鏡下挑出各型菌落，培養於 Tg 半固體培養基內。3－4 天，再以乙炔還原法測定挑出各菌，是否有固氮力。由本研究分離到一種廣泛存在於根圈土的革蘭氏陰性短桿固氮細菌。

參考文獻

1. 川口桂三郎，1980，水田之氮固定作用，土壤肥料通訊324：1689—704（洪崑煌譯）
2. 黃啓穎1977，藍綠藻之固氮作用，科學農業25（9—10）280—286
3. 黃檀溪1982，水田固氮藍綠藻之生態探討，科學發展月刊10(7)，619—631。
4. Balandreau, J., Rinaudo, G., Fares-Hamad I. and Dommergues, Y. 1975. N_2-fixatior in the rhizosphere of rice plants. In Nitrogen-fixation by free-living microorganisms (W. D. P. Stewrat. Ed.) pp. 57-70. Cambridge University press.
5. Brill, W. J. 1977. Biological N_2-fixation. Scient. Am. 236, 68-81.
6. Dommergues, Y., Balandreau, J., Rinaudo, G. and Weinhard, P. 1973. Non-symbiotic N_2-fixation in the rhizosphere of rice, maize and different grasses. Soil Biol. and Biochem. 5, 83-89.
7. Gilmour, J. T., C. M. Gilmour and T. H. Johnston. 1978. Nitrogenase activity of rice plant root systems. Soil Biol. Biochem. Vol. 10 pp. 261-264.
8. Hirota, Y., T. Fujii, Y. Sano., and S. Iyama. 1978. N_2-fixation in the rhizosphere of rice. Nature 276 : 416-417.
9. Ito, O., D. C. Cabrera, and I. Watanabe. 1980. Fixation of dinitrogen-15 associated with rice plants. Appl. Environ. Microbiol. 39(3) : 350-355.
10. Lee, K. K., T. Castro, and T. Yoshida. 1977. N_2-fixation throughout growth and varietal differences in N_2-fixation by the rhizosphere of rice planted in pots. Plant and Soil 48 : 613-619.
11. Watanabe, A. 1962. Effect of Nitrogen-fixing blue-green algae : Tolypothrix tennis on the nitrogenous fertility of paddy soil and on the crop yield of rice plant. Jour. Gen. Appl. Microbiol. 8(2) : 85-91.
12. Watanabe, I., K. K. Lee, B. V. Alimagno, M. Sato, D. C. del Rosario, and M. R. de Guzman. 1977. Biological N_2-fixation in paddy field by in situ acetylene-reduction assays. IRRI. Research papers series No. 3.
13. Yoshida, T. 1975. Biological source of nitrogen in natural ecosystem and crop production. FAO Soil Bull. 27 : 165-174.
14. Yoshida, T. and R. R. Ancajas. 1971. N_2-fixation by bacteria in the root zone of rice. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35 : 156-157. .

Studies of the Microbial Nitrogen-fixation in Rice Roots and Rice Paddies[1]

Chyi-Jiin Lin[2]

Summary

The N_2-fixation rate of the excised rice root was low. The difference of N_2-fixation rate among the eight rice varieties varied in every samplings during rice growth stages, and none have shown a definite trend of higher N_2-fixation rate in every samplings. The nitrogenase activity was highest in the booting stage. The N_2-fixation rate during the first rice crop-season of 1981 was lower than that of the second rice crop-season of 1980. The microbial nitrogenase activity of the rice root was inhibited with the application of 120 kg/ha of N fertilizer. A gram negative rod bacterium which is widely existed on the rice root and responsible for the nitrogen-fixation in the rice root was isolated.

Nitrogen-fixation rate in the rice paddies was very low. No nitrogenase activity was observed in the paddy waters. The nitrogenase activity of the paddy fields grown with rice was higher than that of the paddy fields without grown with rice, it was significantly different in the booting stage. In general, nitrogenase activity in the rhizosphere soil was higher than that of the subsurface soil. Nitrogen-fixing blue green algae such as *Anabaena* sp. and *Nostoc* sp. were isolated from the rice paddies, and a gram negative rod nitrogen-fixing bacterium which is widely distributed in the rhisosphere soil was isolated. Greenhouse experiment was conducted to investigate the effect of ten strains of N_2-fixing blue green algae on the growth response of rice plant. Inoculation of N_2-fixing blue green algae HN 801 was found to give grain yield equal to/or higher than that of the yield of applying 60kg/ha of chemical N fertilizer.

---

1. Contribution No. 1144 from the Taiwan Agricultural Research Institute (TARI). The first part and the second part of this research were supported by the National Science Council (NSC-70-0409-B055-04) and the Council for Agricultural Planning and Development (71 農建 4.1—產 38), respectively, Taiwan, ROC.

2. Soil Miorobiologist, Department of Agricultural Chemistry, TARI, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 431, ROC.